Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

Untersuchungen über die Antikörperbildung nach Verabreichung von schafshypophysärem Gonadotropin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

Wiltraud Beringer, geb. Villinger
aus Neudamm/Neumark

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

Untersuchungen über die Antikörperbildung nach Verabreichung von schafshypophysärem Gonadotropin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

Wiltraud Beringer, geb. Villinger

aus Neudamm/Neumark

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg/Lahn am: 18.12.1973

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan : Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent : Prof. Dr. med.E.Daume, Frauenklinik der Universität Marburg/Lahn

Correferent: Prof. Dr.med. W. Schiff

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Einleitung

I. Ovulationsauslösung mit menschlichen und tierischen Gonadotropinen 1

II. Antikörperbildung nach Anwendung von PMS-HCG und tierischem hypophysärem Gonadotropin sowie HHG und HMG 3

B. Methodik

I. Antigen-Rohsubstanz (Hormon FSH als Präparat SH 820) 9

II. Behandlung von Kaninchen mit FSH (SH 820) 9

III. Technik des Hämagglutinations-Tests 11

1. Antigen-Austestung an Kaninchenseren (Vorversuch) 11

2. Austestung von Kaninchen- und Probandenseren 14

3. Prüfung von Kaninchen-Immunseren und menschlichen Probandenseren im Hämagglutinations-Test (HAT) mit nicht-sensibilisierten Hammelerythrocyten 16

C. Eigene Untersuchungen

I. Antikörperbildung bei Kaninchen nach Behandlung mit FSH (SH 820) 17

II. Untersuchungen von Patientinnen-Seren auf Antihormone bzw. Antikörper nach Behandlung mit hypophysärem FSH vom Schaf (SH 820) 20

1. Hämagglutinations-Test mit sensibilisierten menschlichen O-Blut-Erythrocyten 25

2. Hämagglutinations-Test mit nicht-sensibilisierten Hammel-Erythrocyten 25

III. Therapieerfolge bei den mit SH 820 behandelten Patientinnen - Vergleich unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Antikörper-Titer 34

IV. Untersuchung der Seren unbehandelter, beliebig ausgewählter Personen mit dem Hämagglutinations-Test. 37

D. Besprechung 37

E. Zusammenfassung 47

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0081

A. Einleitung

I. Ovulationsauslösung mit menschlichen und tierischen Gonadotropinen:

Zur Ovulationsauslösung wurden und werden bei Kinderwunsch gonadotrope Hormone zur direkten Stimulation der Ovarien verwendet. Die normalerweise vom Hypophysenvorderlappen (HVL) gebildeten Gonadotropine enthalten die Aktivitäten des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH), das auch als interstitialzellenstimulierendes Hormon (ICSH) bezeichnet wird. Durch die FSH-Aktivität soll, zusammen mit einer gewissen Menge ICSH-Aktivität, der Follikel im Ovarium bis zur Sprungreife stimuliert, durch vorwiegend ICSH-Aktivität der sprungreife Follikel dann zum Platzen gebracht werden.

Entsprechend dieser Vorstellung wird zur Ovulationsauslösung zunächst mit FSH-LH-aktiven Gonadotropinen und anschließend mit HCG (human chorionic gonadotrophin), das praktisch nur LH-Aktivität besitzt, behandelt.
Als vorwiegend FSH-aktiv galt pregnant mare serum gonadotrophin (PMS), ein Präparat aus dem Serum trächtiger Stuten, das bis 1958 praktisch als einziger FSH-Ersatz zur Verfügung stand. ICSH-Aktivität ist im Choriongonadotropin, dem HCG, das aus dem Harn schwangerer Frauen gewonnen und in weitgehend gereinigte Form gebracht wird, vorhanden. Da die therapeutischen Erfolge mit der Kombination PMS-HCG sehr unterschiedlich waren und die lange angenommene vorwiegende FSH- Aktivität in Frage geriet, wurden andere Präparate mit definiert höherer FSH-Aktivität in die

A. Einleitung

I. Ovulationsauslösung mit menschlichen und tierischen Gonadotropinen:

Zur Ovulationsauslösung wurden und werden bei Kinderwunsch gonadotrope Hormone zur direkten Stimulation der Ovarien verwendet. Die normalerweise vom Hypophysenvorderlappen (HVL) gebildeten Gonadotropine enthalten die Aktivitäten des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH), das auch als interstitialzellenstimulierendes Hormon (ICSH) bezeichnet wird. Durch die FSH-Aktivität soll, zusammen mit einer gewissen Menge ICSH-Aktivität, der Follikel im Ovarium bis zur Sprungreife stimuliert, durch vorwiegend ICSH-Aktivität der sprungreife Follikel dann zum Platzen gebracht werden.

Entsprechend dieser Vorstellung wird zur Ovulationsauslösung zunächst mit FSH-LH-aktiven Gonadotropinen und anschließend mit HCG (human chorionic gonadotrophin), das praktisch nur LH-Aktivität besitzt, behandelt.
Als vorwiegend FSH-aktiv galt pregnant mare serum gonadotrophin (PMS), ein Präparat aus dem Serum trächtiger Stuten, das bis 1958 praktisch als einziger FSH-Ersatz zur Verfügung stand. ICSH-Aktivität ist im Choriongonadotropin, dem HCG, das aus dem Harn schwangerer Frauen gewonnen und in weitgehend gereinigte Form gebracht wird, vorhanden. Da die therapeutischen Erfolge mit der Kombination PMS-HCG sehr unterschiedlich waren und die lange angenommene vorwiegende FSH- Aktivität in Frage geriet, wurden andere Präparate mit definiert höherer FSH-Aktivität in die

Therapie, teils bisher auch nur als Research Präparate aufgenommen. Es handelt sich um

Gonadotropine mit FSH- und LH-Aktivität

a) menschlicher Herkunft	b) tierischer Herkunft
HHG (human hypophysial gonadotrophin)	hypophysäres FSH vom Schaf
HMG (human menopausal gonadotrophin)	Schwein
	Pferd

Die klinischen Erfolge waren mit diesen Präparaten in Kombination mit HCG besser als bei PMS und HCG. Zur Anwendung sind bisher nur HHG in beschränktem Umfang, HMG jedoch in größerem Ausmaß gekommen. HHG wird aus menschlichen Hypophysen (Autopsiematerial), HMG aus dem Harn von Frauen nach der Menopause gewonnen. Nachdem erwiesen war, daß auch hypophysäres Schweine-FSH am Menschen gut wirksam ist (DAUME und DÖRNER, 1961), wurde auch dieses Präparat in die Therapie aufgenommen.
Hier steht ein hypophysäres Schafs-FSH als Research Präparat von der Firma SCHERING AG, Berlin, zur Verfügung, das mit HCG beim Menschen ebenfalls wirksam zur Ovulationsauslösung gefunden wurde (DAUME, E.,1965).

Für diese tierischen Präparate erhebt sich jedoch, wie auch schon für das PMS aus der frühen Literatur ersichtlich, die Frage einer Antigenwirkung beim Menschen mit Nebenwirkungen oder eventuellem Wirkungsverlust aufgrund einer Antikörperbildung bei längerer oder mehrmaliger Anwendung.

II. Antikörperbildung nach Anwendung von PMS-HCG und tierischem hypophysärem Gonadotropin sowie HHG und HMG:

Die meisten Proteine, die einem fremden Organismus parenteral zugeführt werden, sind imstande, Antikörper zu bilden. Daauch die Gonadotropine mit FSH- und LH-Aktivität Eiweißkörper, nämlich wasserlösliche Glucoproteide mit einem Molekulargewicht von 30 000 bis 40 000 darstellen, in denen Hexose, Fucose, Hexosamin und N-acetyl-Neuraminsäure enthalten sind (ROOS, 1967), können nach Zufuhr dieser Hormone, die aus artfremden Quellen gewonnen werden, Antikörperbildungen erwartet werden.
Der Antigencharakter der gonadotropen Hormone wird schon seit langem vermutet und ist von vielen, jedoch nicht von allen Autoren bestätigt worden. COLLIP (1935) konnte erstmals bei Tieren, denen über längere Zeit Gonadotropine injiziert wurden, nach anfänglicher Stimulierung der Gonaden eine refraktäre Phase beobachten. Er vermutete damals schon, daß gewisse Hemmstoffe aufgetreten seien und nannte sie "Antihormone". Später wurden derartige Hemmstoffe auch beim Menschen nachgewiesen (SPENCE et al.1938, ØSTERGAARD 1942, 1964, LEATHEM und RAKOFF 1947, JUNGCK et al. 1948, LEATHEM 1949, MADDOCK 1949, MADDOCK et al. 1956 a und b, DÖRFFLER 1958 und KEITEL et al. 1968). Über die Art ihrer Wirkung bestehen unterschiedliche Auffassungen, Danach gibt es sowohl spezifische - artspezifische und/oder hormonspezifische als auch unspezifische Antikörper. Nach Ansicht von ØSTERGAARD (1942, 1964) und COLE et al. (1957) soll es sich dabei um spezifische, d. h. nur gegen das Antigen gerichtete Antihormone handeln, die nicht menschliches Choriongonadotropin oder Hypophysengonadotropin und auch nicht das Hypophysen-gonadotropin

von Kaninchen, Schaf, Schwein oder Pferd hemmen. MADDOCK et al. (1956 a) und ØSTERGAARD (1942, 1964) fanden dies aber nur für PMS bei durchschnittlich 1500 IE (Internationale Einheiten) täglich bzw. 2-3 mal/Woche während einer Behandlungsdauer von 3-4 Wochen und Wiederholungen nach einigen Monaten bestätigt. Eine weitaus größere Zahl von Ergebnissen spricht jedoch eher für das Auftreten von nichtart-spezifischen und nicht-hormonspezifischen Antihormonen im Serum von Mensch und Tier; das bedeutet, daß die Antiseren auch noch mit anderen, artfremden Antigenen in serologischen Tests reagieren. Anders ausgedrückt: Die durch Injektion von Hormonen einer Species gebildeten Hemmstoffe, z. B. Schafs-FSH-Antihormone, können auch gegen menschliches hypophysäres FSH oder gegen PMS gerichtet sein und diese deshalb hemmen; sie sind dann hormonspezifisch, jedoch nicht artspezifisch. Hormon-Unspezifität dagegen drückt sich aus in einer Hemmung z. B. von hypophysärem FSH durch Choriongonadotropin-Antihormone und umgekehrt.
JUNGCK et al. (1948) behandelten Patientinnen mit 50 E/die und MADDOCK (1948, 1949) mit 50 r.u. (rat units)/die von FSH aus Schafshypophysen über 2-3 Monate; LEATHEM und RAKOFF (1948) mit 350-630 r.u. HCG-FSH ("Synapoidin") in 5-9 Monaten, MADDOCK et al. (1956 a und b) mit 25-50 E./die FSH aus Schweinehypophysen und mit 100 E./die FSH aus Schafshypophysen über 2-3 Monate, und DÖRFFLER (1958) mit durchschnittlich 4.800 - 15.000 Einheiten PMS in Kombination mit 4.000 - 11.000 Einheiten HCG über 2-7 Wochen verteilt.

Nahezu übereinstimmend wird von diesen Untersuchern gefunden, daß nach der ersten Behandlung die Hemmstoffe im Zeitraum von 3-12 Wochen auftreten und im

Verlauf von 12-40 Wochen wieder verschwinden. Bei einer zweiten Behandlung mit demselben Hormon bildeten sich wesentlich schneller Hemmstoffe, die unter Umständen noch jahrelang nachweisbar blieben. Das spricht für eine immunologische Sensibilisierung, da eine 2. Injektionsserie Antihormone hervorrufen kann, auch wenn dies bei der 1. Serie nicht geschah (ØSTERGAARD 1942, DÖRFFLER 1958, KEITEL 1968).

Die genannten Autoren berichten auch, daß in etlichen Fällen keine Antihormone auftraten, weder gegen hypophysäres Schafs-FSH noch gegen andere tierische oder menschliche Gonadotropine. LEATHEM (1949) vermißte Antihormonbildung bei 37 von 42 Patientinnen nach Applikation von 180-750 r.u. HCG-FSH ("Synapoidin") in 2-9 Monaten. Mangelnde Antihormonbildung gegen hypophysäres Pferde- oder Schweine-FSH wurde mehrmals beschrieben: SPENCE et al. (1938) beispielsweise behandelte Patientinnen über 21 Wochen mit 30-50 E./2mal pro Woche mit hypophysärem Schweine-FSH; RAKOFF und LEATHEM (1946) injizierten 200-1.500 E.hypophysäres Pferde-FSH in 2-6 Monaten. MANER et al. (1962) behandelten normal menustruierende Frauen über 3-4 Tage mit Schafs-FSH (NIH-FSH S-1; Atlanta, Georgia) in einer Dosis von je 6-12 mg FSH/Tag. Der Zeitraum der Untersuchung auf Antihormone gegen FSH betrug 10 Tage nach der Injektionsserie. Es blieb also jedesmal eine Antihormonbildung aus oder konnte zumindest nicht nachgewiesen werden durch die Untersuchungstechniken, die anfänglich nur die Tierversuche (biologische Tests) kannten und später häufig durch die Serodiagnostik im Hämagglutinations-Test (HAT) in Abwandlung nach MIDDLEBROOK und DUBOS (1948) und v. BOYDEN (1950) sowie den Geldiffusionstest nach Ouchterlony erweitert wurden.

Die Autoren räumen ein, daß in all diesen Fällen die antihormonstimulierende Dosis zu niedrig, die Behandlungsdauer zu kurz oder der Zeitpunkt des Antihormonnachweises möglicherweise zu früh oder zu spät gewählt waren, um mit Sicherheit Antihormone feststellen zu können. LEATHEM (1949) erklärt das Fehlen von Antihormonen als individuelle Variabilität: bei gleichen Dosen und gleichen Verhältnissen lägen aufgrund genetischer Gesichtspunkte unterschiedliche Antworten vor. LEATHEM (1949) MADDOCK et al. (1956 a) und vielen anderen Autoren war seit langem bekannt, daß Behandlungen mit HHG, HMG und HCG beim Menschen keine Antikörperbildung hervorrufen, selbst wenn die Injektionsserien über Jahre fortgeführt wurden, weil diese Hormone homologe Antigene für den Menschen darstellen, nicht aber für Tiere, welche demzufolge bei Applikation von HHG, HMG und HCG Antihormone bilden können.

Diese Erkenntnis schuf neue Wege für serologische Gonadotropin-Nachweise - z.B. die Schwangerschaftsteste - an deren Entwicklung besonders WIDE und GEMZELL (1960) und WIDE (1962) mit dem Hämagglutinationshemmtest für HCG und Mc. KEAN (1960), POLLACK (1961) und Robbins et al. (1962) mit dem Latex-Fixationstest beteiligt waren. Man konnte jedoch bei diesen Techniken die Möglichkeit von Kreuzreaktionen nicht völlig ausschließen, die, unabhängig vom Reinheitsgrad des Antigens, für HCG, FSH und LH auftraten. ROBYN et al. (1969) gelang es, in einem durch Tierversuch gewonnenen HCG-Antiserum das Aktivitätsverhältnis von Anti-HCG und Anti-FSH festzustellen, das nach ihren Angaben 100 : 1 betrug. Da diese Anti-FSH-Aktivität relativ beschränkt ist, scheint sie die Reaktion von HCG-sensibilisierten Erythrocyten und HCG-Antiserum kaum wesentlich zu beeinflussen.

SAXENA und HENNEMAN (1964) konnten von Kaninchen ein Anti-FSH-Serum mit einem Titer bis zu 1:12.800 gewinnen. Eine Kreuzreaktion des FSH-Antiserum mit LH fanden BUTT und LYNCH (1968) sowie HUNTER (1969) unabhängig von der Reinheit des ursprünglichen Antigens im Tierversuch. Sie verabreichten Präparate, die je 100 I.U. (International Units) FSH und LH/mg. Rohmaterial enthielten und gereinigte mit 2.000 I.U. FSH/mg bei weniger als 50 I.U. LH/mg.
Bei diesen Untersuchungen erkannte HUNTER (1969), daß die antigene Eigenschaft bei hypophysären Gonadotropinfraktionen, die FSH und LH enthalten, überwiegend im FSH-Molekül lokalisiert ist.
Um Kreuzreaktionen weitgehend auszuschalten, werden weitere Versuche unternommen, die eine größere Antigenspezifität gewährleisten sollen. So wird neuerdings Immunserum durch die Immunelektrophorese differenziert, und nach Lokalisation der Antikörper werden anschließend Versuchstiere (Kaninchen) mit dem Substrat, das die Präzipitationslinien des FSH enthält, behandelt. Durch Immunabsorption kann eine weitere Reinigung von FSH erzielt werden, indem LH durch Anti-LH gebunden und eliminiert wird. Zu den bedeutendsten Methoden der Hormonbestimmung gehört heute der Radioimmunoassay, der von YALOW und BERSON (1960) sowie HUNTER und GREENWOOD (1962) ausgearbeitet wurde. Für die FSH-Bestimmung gelangen SAXENA et al. (1966) und FRANCHIMONT (1966) die Entwicklung des Radioimmunoassay mit ^{131}J - FSH.

Eine ausführliche Beschreibung von Genauigkeit, Empfindlichkeit und Spezifität des Radioimmunoassay und der durch ihn gewonnenen Antiseren gibt MIDGLEY Jr. (1969). Ihre Wiedergabe und kritische Betrachtung würde aber über das Thema der vorliegenden Arbeit hinausgehen.

ZONDEK und SULMAN (1942) stellten sich die Frage, ob beim Menschen etwa schon normalerweise Antihormone und im besonderen Antigonadotropine vorkommen oder ob sie bei Dysfunktionen vorhanden sind, und mußten sich nach ihren Untersuchungen verneinen: Plasma unbehandelter Personen ergab keine Reaktion mit Schafs-FSH. Diese Untersuchungen sind durchgeführt worden, weil in sehr frühen Arbeiten unspezifische Antigonadotropine beschrieben wurden, die ohne Behandlung bei einer Frau mit Amenorrhoe (TAKAHASHI, 1939), getestet durch Komplementbindungsreaktion (Browning'sche Methode), bei einem Fall von Cushing Syndrom (EISENHARDT und THOMPSON, 1939), getestet im Friedman Test, im Serum einer ovariektomierten Frau sowie bei einem Fall von Oligomenorrhoe (LAROCHE und SIMMONET, 1936), getestet im Tierversuch, aufgetreten sein sollen. Nach LEATHEM (1949) besteht jedoch kein Anlaß zu der Annahme, daß spontane Antihormonbildungen zu Dysfunktionen führen.

Die Folgen der Gonadotropin-Applikationen und der einsetzenden "Antihormonbildung" beim Menschen wurden oftmals als Neutralisation und Hemmung der endogenen Gonadotropine im Sinne einer Verhinderung Ihrer Wirkung beschrieben. So konnte es beispielsweise bei längerer Behandlung von Patientinnen mit hypophysärem Schafs- oder Schweine-FSH (Dosierung 25-50 E./die über 2-3 Monate; Aktivität 1,0/mg bis 5,0/mg) bei funktionstüchtigen Ovarien nach anfänglicher polycystischer Vergrößerung der Ovarien und Brustveränderungen zur Hemmung der zugeführten und endogenen Gonadotropine und zur Manifestierung von subnormalen Östrogenspiegeln kommen, was sich durch Amenorrhoe und klimakterische Symptome äußerte (MADDOCK et al., 1956 a). Aus diesen Gründen war eine Langzeit-Therapie fraglich geworden. Deshalb forderte u.a. schon ØSTERGAARD (1964) entweder eine differenzierte Reihenfolge in der Hormonanwendung oder stärker gereinigte Hormone.

Die widersprüchlichen Angaben in der Literatur und die Unsicherheit in der Bewertung der beschriebenen Antihormonbildungen sind Anlaß weiterer Untersuchungen, die im folgenden beschrieben werden.

B. Methodik

I. Antigen-Rohsubstanz (Hormon FSH als Präparat SH 820):

Die Immunisierung von Kaninchen erfolgte mit follikelstimulierendem Hormon (FSH), das aus Schafshypophysenvorderlappen hergestellt und freundlicherweise von der Schering AG., Berlin, für experimentelle Anwendung zur Verfügung gestellt wurde.

SH 820 (Charge 005) hat nach Angaben aus dem Hauptlabor der Schering A.G., Berlin folgende Kriterien:

FSH-Gehalt	:	2 NIH-E/mg
ICSH-Gehalt	:	steht noch aus
Pyrogene	:	nicht nachweisbar
Maul- und Klauenseuche-Virus	:	negativ
Vasopressin	:	weniger als 0,005 E/mg
spasmogene Wirkung	:	etwa wie 19,5 ng Histamin oder 33,5 ng Acetylcholin pro mg
Verträglichkeit	:	10 mg/kg Ratte i.v. ohne toxische Reaktion

II. Behandlung von Kaninchen mit FSH (SH 820/005):

Zur Behandlung der 6 weiblichen Kaninchen wurde nach folgendem Schema verfahren:

1. Tag: Probepunktionen (Leerblut-Entnahmen),
außerdem erhielten
Tier A) je 2 mg FSH (SH 820) Trockensubstanz,
Tier B) suspensiert in 1 ml 0,9%NaCl-Lösung
(+1 ml Freund'Adjuvans) i.m.

Tier C) je 4 mg FSH (SH 820) in 1 ml 0,9%NaCl
Tier D) (+1 ml Freund-Adjuvans) i.m.

18.Tag: Tier A)
Tier B) je 4 mg FSH (SH 820) in 1 ml 0,9% NaCl i.m.
+ 1 ml Freund'Adjuv.

Tier C)
Tier D) je 8 mg FSH (SH 820) in 1 ml 0,9% NaCl i.m.
+ 1 ml Freund'Adjuv.

34.Tag: Tier A)
Tier B) je 8 mg FSH (SH 820) in 1 ml 0,9% NaCl i.m.
+ 1 ml Freund'Adjuv.

Tier C)
Tier D) je 16 mg FSH (SH 820) in 1 ml 0,9% NaCl i.m.
+ 1 ml Freund'Adjuv.

52.Tag: Tier A)
Tier B) je 4 mg FSH (SH 820) in 1 ml 0,9% NaCl
(Ohrvene) i.v.

Tier C)
Tier D) je 8 mg FSH (SH 820) in 1 ml 0,9% NaCl i.V.

(Injektionen jeweils im Abstand von 16 - 18 Tagen;
Dauer der Behandlung insgesamt 7 1/2 Wochen)

Tier E)
Tier F) 1. Behandlung: 1 Woche lang je 2,5 mg
FSH (SH 820) in 1 ml 0,9%
NaCl i.v.

2. Behandlung: nach einer Pause von 5 Wochen erfolgten weitere Injektionen in 2-tägigem Abstand noch 3-mal mit je 2,5 mg FSH (SH 820) in 1 ml 0,9% NaCl i.v.

Die Tiere Aund B erhielten also insgesamt je 18 mg i.m./i.v., die Tiere C und D insgesamt je 36 mg i.m./i.v. und die Tiere E und F erhielten
bei der ersten Immunisierung je 17,5 mg i.v.,
bei der zweiten Immunisierung je 7,5 mg i.v.,
d.h. insgesamt also je 25 mg FSH (SH 820).

Jeweils eine Woche nach der letzten Injektion wurde Blut aus der Ohrarterie entnommen und daraus durch Zentrifugieren Serum gewonnen.

III. Technik des Hämagglutinations-Tests:

In Anlehnung an die von MIDDLEBROOK und DUBOS (1948) und die von v. BOYDEN (1950) angegebenen Techniken erfolgte die Ausführung des Hämagglutinationstests (HAT), unter Verwendung des Enzyms Papain zur beschleunigten Sensibilisierung ("Beladung") der Blutkörperchen. Es wurde in folgenden Schritten vorgegangen:

1. Antigen-Austestung an Kaninchenseren (Vorversuch):

Um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen, war es notwendig, das Antigen genau einzustellen:

Sensibilisierung von menschlichen Erythrocyten (O-Blut):

a) Erythrocyten-Sediment (menschliches O-Blut) dreimal mit reichlich physiologischer NaCl-Lösung waschen und bei 2600 U/min. zentrifugieren (Zentrifuge Martin Christ, Osterode/Harz; g-Zahl 2.000, Modell Universal Junior II).

b) 50 mg Papain in 5 ml physiolog. NaCl-Lösung lösen (1 %), 15 Minuten im Wasserbad schütteln bei 37° C, dann abfiltrieren.

c) 30 mg FSH (SH 820) in 3 ml physiol. NaCl-Lösung lösen (1 %), d. h. 1 mg FSH (SH 820)/0,1 ml physiol. NaCl.-Lösung.

d) Zu 3 Ansätzen von 0,05 ml des gewaschenen O-Blut-Sediments + 0,125 ml der abfiltrierten 1%-igen Papainlösung werden jeweils folgende Mengen Antigenlösung zugesetzt:

+ 1) 0,5 ml der 1%-igen FSH (SH 820)-Lösung
+ 2) 1,0 ml " " " "
+ 3) 1,5 ml " " " "

e) Das Gemisch für 2 Stunden ins Wasserbad (37° C) stellen.

f) Nach der Sensibilisierung der O-Blut-Erythrocyten diese 3-mal mit ca. 5 ml physiologischer NaCl-Lösung waschen und zentrifugieren (2.000 U/min.). Dann den Rückstand von je 0,05 ml mit je 4,95 ml physiol. NaCl-Lösung resuspensieren, sodaß eine 1%-ige Suspension entsteht.

Herstellung von Verdünnungsreihen des Immunserums:

Die Ausführung erfolgte auf einer Plexiglas-Hämagglutinationsplatte (Prestware Ltd., London, mit 80 kalottenförmigen Vertiefungen von 16 x 11 mm):

a) je 0,2 ml physiol. NaCl-Lösung in allen Vertiefungen von 3 Reihen der Platte geben (außer in 2 Vertiefungen jeder Reihe, nämlich der ersten und der letzten).

b) Immunserum, gewonnen aus einem mit FSH (SH 820) behandelten Kaninchen, wie folgt verdünnen:

0,1 ml Immunserum
\+ 1,9 ml physiol. NaCl-Lösung (Serumverdünnung 1 : 20)

c) Von der Serumverdünnung gibt man je 0,2 ml in die 1. und 2. Vertiefung jeder Reihe, ebenso in die letzte Vertiefung (für die Kontrolle mit nicht-sensibilisierten Erythrocyten).
0,2 ml des (gut vermischten) Inhalts aus der 2. Vertiefung (Verdünnung 1 : 40) in die 3. Vertiefung überpipettieren (Verdünnung 1 : 80), wiederum 0,2 ml daraus entnehmen und in die 4. geben (Verdünnung 1 : 160) etc. bis zur vorletzten Vertiefung, wo wieder 0,2 ml entnommen und verworfen wird.

Erklärung:
Es handelt sich also um geometrische Verdünnungsreihen des Immunserums (Antikörperserums) mit dem Faktor 2, beginnend mit der Verdünnung 1 : 20 in physiologischer NaCl-Lösung.

Antigen-Antikörper-Reaktion:

Jede Serumverdünnung wird mit 0,2 ml einer 1%-igen Erythrocyten-Suspension versetzt. Bei der Reihe 1 dient der Ansatz d1 als Antigen, bei der Reihe 2 d2 und bei der Reihe 3 d3.
Zur Kontrolle dient jeweils die stärkste Serumkonzentration, hier 1 : 20 (in der letzten Vertiefung jeder Reihe), auf die 0,2 ml von nicht-sensibilisiertem, gewaschenem O-Blut-Sediment in der Verdünnung 1 : 100 aufpipettiert wird.
Das Hämagglutinations-Tablett wird dann für 2 Stunden ins Wasserbad bei 37° C ("feuchte Kammer") und danach in den Kühlschrank gegeben.
Ablesen der Ergebnisse am folgenden Tag nach 18 Stunden im Kühlschrank.

Ergebnisse der Antigen-Austestung:

			Serumverdünnungen 1:x					
O-Blut-Sediment (ml)	Sensibilisierung mit FSH (SH 820) (mg)	Erythrocytenverdünnung	Kontrolle 20	20	40	80	160	320
0,05	5	1 : 100	-	+	+	+	+	-
0,05	10	1 : 100	-	+	+	+	-	-
0,05	15	1 : 100	-	+	+	+	-	-

Tab. 1: Antikörpertiter eines Serums in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration bei der Antigen-Austestung.

Die ausgetestete Antigenmenge, in diesem Fall 5 mg FSH (SH 820), bei der der höchste Serumtiter (hier 1 : 160) erreicht wurde, kam bei weiteren Sensibilisierungen in entsprechendem Mengenverhältnis zur Anwendung.

2. Austestung von Kaninchen- und Probandenseren:

Von den zu prüfenden Seren werden wie im Vorversuch geometrische Verdünnungsreihen mit dem Faktor 2 in physiologischer NaCl-Lösung hergestellt. Um jedoch auch niedrige Titer zu erfassen, wird mit der Serumverdünnung 1 : 5 begonnen. Entsprechend werden auch die Kontrollen mit nicht-sensibilisierten Erythrocyten mit der Serumverdünnung 1 : 5 angesetzt.
Die Menge der anzusetzenden Erythrocyten-Suspension richtet sich nach der Anzahl der zu testenden Seren. Das Verhältnis von Erythrocytensediment zu Antigen wird im Vorversuch ermittelt. Bei Verwendung einer neuen Antigencharge ist die Austestung des Antigens zu wiederholen (wie unter 1 beschrieben).

Die Ablesung der Reaktion erfolgt wiederum nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden im Wasserbad bei 37° C und 18 Stunden im Kühlschrank:

als positiv wird ein flächenhaftes Sediment bzw. eine Ringbildung betrachtet, als negativ ein punktförmiges Sediment bzw. ein kleiner Ring am Boden der Plattenvertiefung.

Abbildung 1 soll mit beliebig ausgewählten Seren als Beispiel für positive und negative Bewertung dienen.

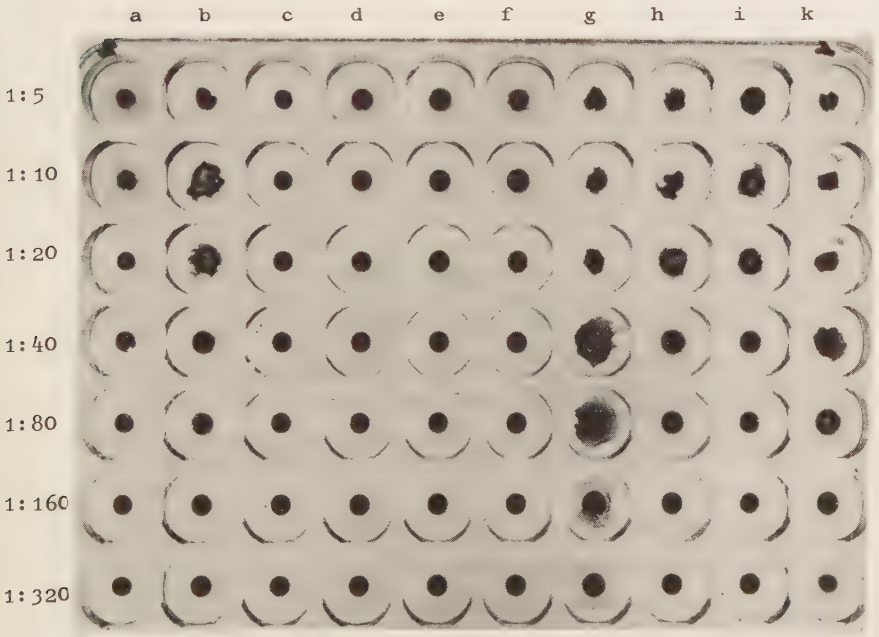


Abb. 1: Hämagglutinations-Test auf Antikörper ausgeführt auf einem Prestware-Hämagglutinationstablett. (Diese beliebig ausgewählten Seren dienen nur zur Veranschaulichung und haben keine Beziehung zu den noch zu besprechenden Ergebnissen.)

Die senkrechten Reihen stellen die Verdünnungsstufen der einzelnen Seren a - k dar. Die Seren c), d) und e) sind negativ. Die Seren a) und f) zeigen einen Titer von 1 : 5, die Seren b), h) und i) einen Titer von 1 : 20, das Serum k) einen Titer von 1 : 80 und das Serum g) einen Titer von 1 : 320. Außer den gezeigten Serumverdünnungen gehören zu jedem Test Serumkontrollen mit der stärksten Serumkonzentration, die hier nicht abgebildet sind.

3. Prüfung von Kaninchen-Immunseren und menschlichen Probandenseren im Hämagglutinations-Test (HAT) mit nicht-sensibilisierten Hammelerythrocyten:

Hammelerythrocyten-Sediment wird 3-mal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, danach wird eine 1%-ige Suspension hergestellt, die als Antigen dient.

Die Seren werden wie beschrieben in geometrischen Verdünnungsreihen mit dem Faktor 2 in Prestware-Hämagglutinationsplatten in 0,2 ml Menge angesetzt. Danach wird 0,2 ml der 1%-igen Hammelerythrocyten-Suspension zugegeben und wie üblich inkubiert.

C. Eigene Untersuchungen

Das von der Firma SCHERING AG, Berlin, hergestellte hypophysäre Schafs-FSH, SH 820 bezeichnet, kommt in seiner Reinheit dem NIH - FSH (National Institute of Health, Bethesda)-Standard nahe.

Es liegt ein Untersuchungsmaterial (Seren) von insgesamt 14 Patientinnen vor, die kurzfristig zur Ovulationsauslösung, teils auch wiederholt mit SH 820 bei Kinderwunsch behandelt wurden. Um die serologischen

Untersuchungen der Patientinnenseren mit dem Hämagglutinationstest auf Antikörperbildung zu überprüfen und gegebenenfalls Vergleiche anzustellen, wurden zusätzlich 6 reife weibliche Kaninchen mit SH 820 behandelt und ihre Seren auf Antihormone untersucht, da bekannt ist, daß Kaninchen im allgemeinen gute Antikörperbildner sind. Das Interesse galt dem Titerverlauf im Hämagglutinations-Test bei den menschlichen und tierexperimentellen Immunseren während der verschiedenen Behandlungs-Phasen, verglichen mit der Hormondosis, der Anzahl der Behandlungen und den Therapieerfolgen.

I. Antikörperbildung bei Kaninchen nach Behandlung mit FSH (SH 820):

Alle Untersuchungen der Kaninchen-Immunseren erfolgten eine Woche nach der letzten Injektion jeder Behandlungsreihe.

In der Tabelle 2 und Abbildung 2 sind die Zusammenhänge zwischen Hormondosis FSH (SH 820), Applikationsart-intramuskulär und/oder intravenös - und Behandlungsdauer dargestellt.

Serumverdünnung 1 : x

Tier	5	10	20	40	80	K	Behandl. Dauer (Wo.insg)	Ges.Dos. FSH (SH820) pro Kur	Applik. Art (mg FSH)	Injekt.-Intervall (i.Tagen)
A_L^o	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
A_1	+	-	-	-	-	-	7,5	18 mg	2/4/8i.m. 4 i.v.	17
B_L^o	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
B_1	+	-	-	-	-	-	7,5	18 mg	2/4/8i.m. 4 i.v.	17
C_L^o	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
C_1	+	+	-	-	-	-	7,5	36 mg	4/8/16i.m. 8 i.v.	17
D_L^o	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
D_1	+	+	-	-	-	-	7,5	36 mg	4/8/16i.m. 8 i.v.	17
E_L^o	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
E_1	+	+	+	-	-	-	1	17,5 mg	7x2,5i.v.	0 (tägl.)
	(5 Wochen therapiefreies Intervall)									
E_2	+	+	+	+	-	-	(1+)1	7,5 mg	3x2,5i.v.	2
F_L^o	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
F_1	+	+	+	-	-	-	1	17,5 mg	7x2,5i.v.	0 (tägl.)
	(5 Wochen therapiefreies Intervall)									
F_2	+	+	+	+	-	-	(1+)1	7,5 mg	3x2,5i.v.	2

Tab. 2: Antikörpertiter der Kaninchen-Immunseren im Hämagglutinations-Test (HAT) mit sensibilisiertem menschlichem O-Blut in Abhängigkeit von der Behandlungsdosis mit hypophysärem Schafs-FSH (SH 820), der Dauer der Behandlung und der Applikationsart.

L^o bedeutet Leerserum, d.h. vor der Behandlung mit SH 820 gewonnen.

A_1 z.B. bedeutet 1. Behandlung von Tier A.

E_2/F_2 z.B. bedeutet 2. Behandlung von Tier E und F (nach einem therapiefreien Intervall von 5 Wochen).

K = Kontrolle mit nicht-sensibilisierten Blutkörperchen.

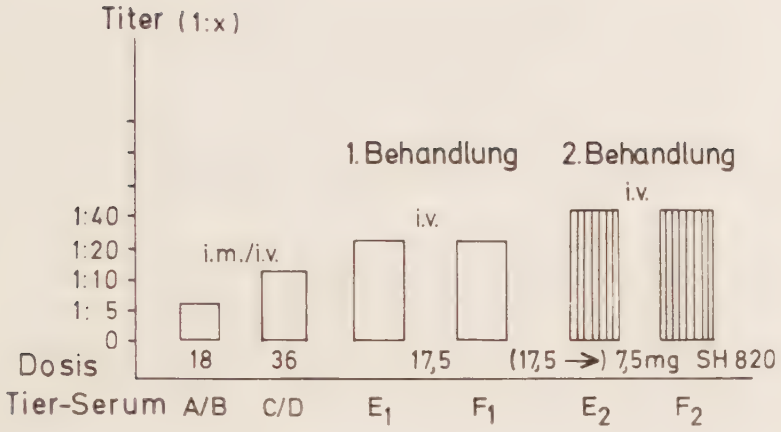


Abb. 2: Antikörpertiter der Kaninchen-Immunseren im Hämagglutinations-Test in Abhängigkeit von der Hormondosis FSH (SH 820) und der Applikationsart.

Es ergeben sich folgende Resultate:

Bei den Tierpaaren A/B und C/D zeigte sich nach 3 intramuskulären und 1 intravenösen Injektion von insgesamt 18 mg bzw. 36 mg FSH (SH 820), appliziert im Zeitraum von 7,5 Wochen, in der 8. Woche nur geringe Titer von 1 : 5 bzw. 1 : 10 im Hämagglutinations-Test.
Die Tiere E und F, die das Hormon bei der 1.Behandlung täglich eine Woche lang nur intravenös appliziert bekommen hatten, wiesen schon bei einer Menge von insgesamt 17,5 mg FSH (SH 820) im HAT einen Serumtiter von 1 : 20 auf. Nach einer Unterbrechung von 5 Wochen fand die 2. Behandlung der Tiere E und F mit 3 intravenösen Injektionen innerhalb einer Woche mit nur insgesamt 7,5 mg FSH (SH 820) je Tier statt. Danach stieg der Titer bei beiden Tieren auf 1 : 40 an.

Obwohl die Titerschwankungen nur gering sind, läßt sich die Tendenz ablesen, daß das Auftreten der Antikörper in Abhängigkeit von der Hormondosis und Applikationsart steht. Auch zeigt sich nach der 2. Behandlung die Tendenz zum Titeranstieg, obwohl die Hormondosis niedriger war als bei der 1.Behandlung.

Da das verwendete Hormon von Schafen gewonnen war, wurden alle Seren im Hämagglutinations-Test auf ihre Reaktion mit Hammelerythrocyten geprüft.

Es zeigte sich, daß b e i k e i n e m d e r V e r s u c h s t i e r e im Hämagglutinations-Test m i t r e i n e n , n i c h t - s e n s i b i l i - s i e r t e n H a m m e l e r y t h r o c y t e n e i n A n t i k ö r p e r - T i t e r feststellbar war.

II. Untersuchungen von Patientinnen - Seren auf Antihormone bzw. Antikörper nach Behandlung mit hypophysärem FSH vom Schaf (SH 820):

Neun Patientinnen mit dringendem Kinderwunsch bei primärer und sekundärer Amenorrhoe oder Oligomenorrhoe wurden mit Gonadotropinen zum Zweck einer Ovulationsauslösung behandelt. Die meisten Patientinnen erhielten mehrere Gonadotropinkuren, die Dosierung und Behandlungsdauer variierten je nach den klinisch aus

den Zervixfaktoren ablesbaren Reaktionen. Als Gonadotropinpräparate wurden zunächst ausschließlich menschliche Gonadotropine und zwar ein aus Postmenopausen-Harn gewonnenes HMG (Humegon) zur Follikelstimulierung und ein aus Schwangeren-Harn isoliertes Choriongonadotropin (HCG) zur Ovulationsauslösung und Luteinisierung verabreicht.

Anstelle von HMG wurde später bei diesen 9 Patientinnen ein FSH-aktives Präparat aus Schafshypophysen verwendet, das von der Firma SCHERING AG, Berlin unter der Bezeichnung SH 820 zur Verfügung gestellt wurde.

Eine Patientin erhielt nach einer Behandlung mit SH 820 / HCG in einer folgenden Kur als FSH-aktives Präparat PMS, ein aus dem Serum trächtiger Stuten gewonnenes Gonadotropin.

Von HMG - HCG - Kuren ist bekannt, daß hierdurch beim Menschen keine Antikörperbildung erfolgt, weswegen in dieser Richtung auch keine Untersuchungen angestellt wurden.

SH 820 hat als tierisches Proteohormon potentiellen Antigencharakter wie auch PMS.

Die verwendeten Chargen von SH 820 sind durch folgende Daten charakterisiert:

Charge	mg Substanz pro Ampulle	FSH-Aktivität in NIH-FSH-S[2] Einheit./Amp.	LH-Aktivität in NIH-LH-S[3] Einheit./Ampulle
SH 820/I	30	10	1,5
SH 820/II	15	12	0,5
SH 820/III	7	7	0,3 (NIH-LH-S[1])

Tab. 3: Antigenchargen I, II und III des Präparates SH 820 der SCHERING AG, Berlin.

Die Dosierungen von SH 820 lagen bei täglichen Mengen von

Charge I 10 - 15 mg Substanz, das entspricht 3,3 - 5 Einheiten NIH-FSH,
Charge II 15 mg Substanz, das entspricht 12 Einheiten NIH-FSH,
Charge III 15 - 22,5 mg Substanz, das entspricht 7 - 10,5 Einheiten NIH-FSH.

Die Gesamtdosen pro Kur lagen zwischen 90-210 mg Substanz, das entspricht 42 - 168 Einheiten NIH-FSH-Aktivität.
Die Gesamtdosen aller Kuren betrugen für die einzelnen Patientinnen zwischen 90 - 462,5 mg Substanz, das entspricht 42 - 238,5 Einheiten NIH-FSH-Aktivität.
HCG wurde je nach Bedarf anschließend in Tagesdosen von 5.000 I.E. über 4-6 Tage gegeben.

Im einzelnen waren die SH 820 - Kuren folgendermaßen gestaltet:

Pat.	Behandl. dauer m. SH 820 (Tage)	Charge von SH 820	Einzel-dosis (mg Substanz pro Tag	Gesamtdosis (mg Subst.)		SH 820-freies Intervall (Wochen)
				alle Kuren	Einzel-Kur	
PAR	16	I	10/15	190	190	
RE	10	I	10	200	100	 8
	10	I	10		100	
BU	10	I	10	462,5	100	 8
	10	I	10		100	18
	10	II	15		150	25
	5	III	22,5		112,5	
OB	5	III	22,5	202,5	112,5	13
	4	III	22,5		90	
KE	12	I	15	180	180	
PAP	10	I	15	315	150	25
	11	II	15		165	
BA	9	III	22,5	202,5	202,5	
PF	15	I	10/15	410	200	33
	14	II	15		210	
BE	6	III	15	90	90	

Tab. 4: Behandlungsdauer und -dosis mit SH 820 bei 9 Patientinnen.

Wie sich die Reihenfolge der einzelnen Patientinnen-Behandlung gestaltete, soll folgende Tabelle wiedergeben:
(+ = therapiefreie Zeit zwischen den Behandlungen (Wochen)).

Patientinnen

	PAR	RE	BU	OB	KE	PAP	BA	PF	BE
Kur	HMG HCG	HMG HCG	HMG HCG	SH 820 HCG	HMG HCG	HMG HCG	SH 820 HCG	HMG HCG	SH 8 HCG
TF+	19	20	10	13	2	15	11	5	
Kur	HMG HCG	HMG HCG	HMG HCG	SH 820 HCG	SH 820 HCG	SH 820 HCG	PMS HCG	SH 820 HCG	
TF	8	2	11	10	0,5	25	10	22	
Kur	SH 820 HCG	HMG HCG	SH 820 HCG	HMG HCG	HMG HCG	SH 820 HCG	HMG HCG	HMG HCG	
TF	8	6	8					11	
Kur	HMG HCG	SH 820 HCG	SH 820 HCG					SH 820 HCG	
TF		8	9					18	
Kur		SH 820 HCG	HMG HCG					HMG HCG	
TF			9						
Kur			SH 820 HCG						
TF			15						
Kur			HMG HCG						
TF			10						
Kur			SH 820 HCG						

Tab. 5: Reihenfolge der einzelnen Patientinnen-Behandlungen mit den Kombinationen HMG/HCG, PMS/HCG und hypophys. Schafs-FSH (SH 820).

Prüfung der Patientinnen - Seren mit dem Hämagglutinations-Test:

Die Entnahme von Patientinnenblut und Herstellung der Seren zur Prüfung auf Antikörper bzw. Antihormone erfolgte vor den SH 820 - Kuren und zu verschiedenen Zeiten nach Abschluß der SH 820-HCG-Behandlungen. Die Zeitintervalle und die jeweils verabreichten SH 820 - Dosen sind aus Tabelle 6 zu ersehen.

Die Untersuchungen erfolgten zweimal bis 10 Wochen, zweimal bis ca. 20 Wochen und fünfmal zwischen 37 und maximal 67 Wochen nach Erstbehandlung.

1. Hämagglutinations-Test mit sensibilisierten menschlichen O-Blut-Erythrocyten:

Beim Hämagglutinations-Test der Patientinnenseren wurden die menschlichen O-Blut-Erythrocyten mit 3,5 mg SH 820 pro 1 ml physiolog. NaCl-Lösung beladen.

In keinem der Patientinnenseren konnten Antikörper gegen FSH im Hämagglutinations-Test nachgewiesen werden.

2. Hämagglutinations-Test mit nicht-sensibilisierten Hammel-Erythrocyten:

Die Patientinnen-Seren wurden nun ebenfalls mit unbehandelten Hammelerythrocyten im HAT geprüft. Es ergaben sich folgende Titerverläufe:

Tabelle 6 (Text Seite 27)

Serumverdünnung 1:x

Pat.	5	10	20	40	80	160	320	K°	Punktion n.Injekt. Beginn(Wo) pro Kur	Punktion n.Injekt. Beginn(Wo) insg. n.Beg.	Ges.Dos. SH 820 (mg Substanz)	SH 820-freies Intervall (Wochen)
PAR I	+	+	-	-	-	-	-	-	0		190	
II	+	+	+	-	-	-	-	-	3			
III	+	+	+	+	-	-	-	-	5			
IV	+	+	+	+	+	-	-	-	11	11		
RE I	-	-	-	-	-	-	-	-	0		100	
II	+	-	-	-	-	-	-	-	3		100	.. 8
III	+	+	-	-	-	-	-	-	4			
IV	+	+	-	-	-	-	-	-	11	19		
V	+	+	-	-	-	-	-	-	20	28		
VI	+	+	-	-	-	-	-	-	27	35		
VII	+	+	+	-	-	-	-	-	33	41		
VIII	+	+	+	-	-	-	-	-	40	48		
BU I	+	-	-	-	-	-	-	-	0		100	
II	+	+	+	+	-	-	-	-	2			
III	+	+	+	+	-	-	-	-	3			.. 8
IV	+	+	+	+	-	-	-	-	7			
V	+	+	+	+	-	-	-	-	8		100	
VI	+	+	+	+	-	-	-	-	5	13		
VII	+	+	+	-	-	-	-	-	10	18		..18
VIII	+	+	+	-	-	-	-	-	12	20	150	
IX	+	+	+	+	+	-	-	-	9	35		..25
X	+	+	+	+	+	-	-	-	3	54	112,5	
XI	+	+	+	+	+	-	-	-	6	57		
OB I	+	+	+	+	+	-	-	-	1		112,5	
II	+	+	+	+	-	-	-	-	13		90	..13
									11	24		
KE I	-	-	-	-	-	-	-	-	0		180	
II	+	+	+	+	+	-	-	-	2			
III	+	+	+	+	+	+	-	-	4			
IV	+	+	+	+	+	+	+	-	5			
V	+	+	+	+	+	+	+	-	7			
VI	+	+	+	+	+	+	+	-	9	9		
PAP I	-	-	-	-	-	-	-	-	0		150	
II	-	-	-	-	-	-	-	-	26		165	..25
III	-	-	-	-	-	-	-	-	4	29		
IV	-	-	-	-	-	-	-	-	42	67		
BA I	+	+	-	-	-	-	-	-	0		202,5	
II	+	+	+	+	-	-	-	-	9			
III	+	+	-	-	-	-	-	-	14			
IV	+	+	+	-	-	-	-	-	23			
V	+	+	+	-	-	-	-	-	37	37		
PF I	-	-	-	-	-	-	-	-	4		200	
II	-	-	-	-	-	-	-	-	6			..33
III	-	-	-	-	-	-	-	-	22		210	
IV	-	-	-	-	-	-	-	-	12	45		
BE I	-	-	-	-	-	-	-	-	0		90	
II	-	-	-	-	-	-	-	-	3			
III	+	-	-	-	-	-	-	-	9			
IV	+	-	-	-	-	-	-	-	18	18		

Legende zur Tabelle 6 (Text Seite 26):

Titerverlauf der Patientinnen-Seren im Hämagglutinations-Test mit nicht-sensibilisierten Hammel-Erythrocyten, verglichen mit dem Zeitpunkt der Blutentnahme nach Behandlungsbeginn, den SH 820 - Gesamtdosen und dem therapiefreien Intervall zwischen den einzelnen Behandlungen.

I bis XI bedeuten Anzahl der Blutentnahmen, wobei I meist der Blutentnahme vor Behandlungsbeginn entspricht. Bei Patientin OB und PF jedoch fehlen diese "Null"-Seren, weshalb hier I lediglich die 1. Blutentnahme bedeutet, die nach Behandlungsbeginn erfolgte.

Pat.	Kuren	SH 820-Ges.Dos. (mg)	Titer vor d.Kur (1:x)	Titer nach den SH 820 - Kuren (1:x) 1-5	5-10	10-15	15-20	20-30	30-40	40-50 Wochen
PAR	I	190	10	20	40	80				
RE	I	100	-	5/10						
	$II^{+}_{8Wo.}$	100				10		10	20	
BU	I	100	5	40	40					
	II_{8}	100			40	20				
	III_{18}	150			80					
	IV_{25}	112,5		80	80					
OB	I	112,5	?			80				
	II_{13}	90				40				
KE	I	180	-	80/160	320					
PAP	I	150	-			-	-	-		
	II_{25}	165		-						(5)
BA	I	202,5	10		40	10		20	20	
PF	I	200	?	-	-			-		
	II_{33}	210				-				
BE	I	90	-	-	5		5			

Tab. 7: Zusammenhang zwischen Auftreten der Antikörper und Titerhöhe in Abhängigkeit von der Gesamtdosis der einzelnen SH 820 - Behandlungen.

$II^{+}_{8\ Wo.}$ z.B. bedeutet: 2.SH-820-Behandlung nach 8wöchigem therapiefreiem Intervall.

Anzahl der Kuren	Anzahl der Pat.	Antikörperbildung	Dosis SH 820 je Kur (mg Substanz)	insg.	SH 820-Charge	max. Titer (1:x)	untersuchter Zeitraum (Wo)
1	4	pos. 3	190	190	I	80	11
			180	180	I	320	9
			202	202	III	40	37
		neg./1 unsicher	90	90	III	(5)	18
2	4	pos. 2	100/100	200	I/I	20	48
			112/90	202	III/III	80	24
		neg./2 unsicher	150/165	315	I/II	(5)	67
			200/210	410	I/II	-	45
4	1	pos. 1	100	462	I	80	57
			100		I		
			150		II		
		neg./o unsicher	112		III		
			-	-	-	-	-

Tab. 8: Positiver und negativer Antikörper-Nachweis in den Patientinnen-Seren beim Hämagglutinations-Test mit nicht-sensibilisierten Hammel-Erythrocyten, im Vergleich zu der Anzahl der Kuren mit SH 820, der Gesamt-Dosis SH 820 und den Chargen I, II und III des Präparats sowie dem untersuchten Zeitraum.

Aus den Tabellen 6, 7 und 8 lassen sich folgende Ergebnisse ablesen:

Titer im Hämagglutinations-Test vor der Behandlung:

3 von 7 Patientinnen (bei 2 Patientinnen lagen keine Blutentnahmen vor den Kuren vor) hatten schon vor der 1. Behandlung mit hypophysärem Schafs - FSH (SH 820) positive Antikörper - Titer in der Höhe 1:5 bis 1:10.

a. 2 dieser Seren hatten 1 - 5 Wochen nach der 1. Behandlung einen Titer von 1 : 20 und 1 : 40. Die Gesamtdosis betrug 190 und 100 mg SH 820.

b. 1 Patientin wies 9 Wochen nach der 1. Behandlung den Titer 1 : 40 auf.

Die Gesamtdosis betrug 202,5 mg SH 820.

nach der 1. Behandlung:

Von den 4 Patientinnen ohne Antikörper vor der Therapie und 2 weiteren ohne Null-Wert wurden folgende Befunde erhoben:

a. In 2 Fällen traten zwischen der 1.-5.Woche AK-Titer von 1 : 10 und 1 : 160 nach der 1. Behandlung auf. Die Gesamtdosis betrug 100-180 mg SH 820.

b. In einem Fall lag das erstmalige Auftreten von Antikörpern 9 Wochen nach der 1. Behandlung mit dem Titer 1 : 5.
Die Gesamtdosis betrug 90 mg SH 820.

c. 1 Patientin wies erst 13 Wochen nach der 1. Behandlung einen positiven Titer von 1 : 80 auf. Die Gesamtdosis betrug 112,5 mg SH 820.

d. Bei 2 Patientinnen waren im Zeitraum von etwa 30 Wochen nach der 1. Behandlung überhaupt keine AK mit dem Hämagglutinations-Test nachzuweisen. Die Gesamtdosis betrug 150-200 SH 820.

nach der 2. Behandlung:

Es handelt sich dabei um 5 Patientinnen, von denen 3 Antikörper und 2 keine Antikörper nach der 1. Behandlung aufgewiesen hatten. Nach der 2. Behandlung wurden die folgenden Befunde erhoben:

a. Bei 2 Patientinnen blieb der AK-Titer von 1 : 10 und 1 : 40 vor und 5 - 15 Wochen nach der 2. Behandlung unverändert bestehen.
Die Gesamtdosis der 1. Kur betrug je 100 mg, die Gesamtdosis der 2. Kur betrug ebenfalls je 100 mg SH 820.
Das therapiefreie Intervall zwischen den Behandlungen umfaßte jeweils 8 Wochen.

b. In 1 Fall war 13 Wochen nach der 2. Behandlung der zuvor mit 1 : 80 bestimmte Titer auf 1 : 40 abgefallen; aus dem Intervall liegen keine Werte vor.
Die Gesamtdosis der 1. Kur betrug 112,5 mg, die Gesamtdosis der 2. Kur betrug 90 mg SH 820.
Das therapiefreie Intervall umfaßte 13 Wochen.

c. In 1 Fall trat erst 42 Wochen nach der 2. Behandlung ein positiver Titer von 1 : 5 auf (der aber für einen eindeutigen AK-Nachweis sehr fraglich und daher im Ergebnis zu vernachlässigen ist aufgrund seiner geringen Höhe und dem sehr verzögerten Auftreten).
Die Gesamtdosis der 1. Kur betrug 150 mg SH 820, die Gesamtdosis der 2. Kur betrug 165 mg SH 820.
Das therapiefreie Intervall umfaßte 25 Wochen.

d. 1 Patientin zeigte weder nach der 1. noch nach der 2. Behandlung einen positiven Titer.
Die Gesamtdosis der 1. Kur betrug 200 mg SH 820, die Gesamtdosis der 2. Kur betrug 210 mg SH 820.
Das therapiefreie Intervall umfaßte 33 Wochen.

<u>nach der 3. bzw. 4. Behandlung:</u>

In 1 Fall, der nach der 2. Kur noch einen Titer von 1 : 20 hatte, ergab sich 9 Wochen nach der 3. Behandlung ein Titer von 1 : 80, der auch 3 Wochen nach der 4. Behandlung unverändert 1 : 80 betrug.

Die Gesamtdosis der 1. und der 2. Kur betrug je 100 mg SH 820, die Gesamtdosis der 3. Kur betrug 150 mg SH 820, die Gesamtdosis der 4. Kur betrug 112,5 mg SH 820. Das therapiefreie Intervall I-II umfaßte 8 Wochen, das Intervall II-III 18 Wochen und das Intervall III-IV 25 Wochen.

Zusammenfassend ergibt sich, daß - abgesehen von den Patientinnen-Seren, bei denen schon vor der SH 820 - Behandlung ein positiver AK-Titer bestand -

a. zwischen der 1.-15. Woche nach der 1. Behandlung ein positiver AK-Titer auftrat; die Höhe des Anfangstiters differierte zwischen 1 : 5 und 1 : 80,

b. zwischen der 5.-15. Woche nach der 2. Behandlung der Anfangstiter 1 : 10 bis 1 : 40 betrug (therapiefreies Intervall 8 - 13 Wochen),

c. zwischen der 1.-10. Woche nach einer 3. bzw. 4. Behandlung der Anfangstiter 1 : 80 betrug (therapiefreies Intervall 8/18/25 Wochen).

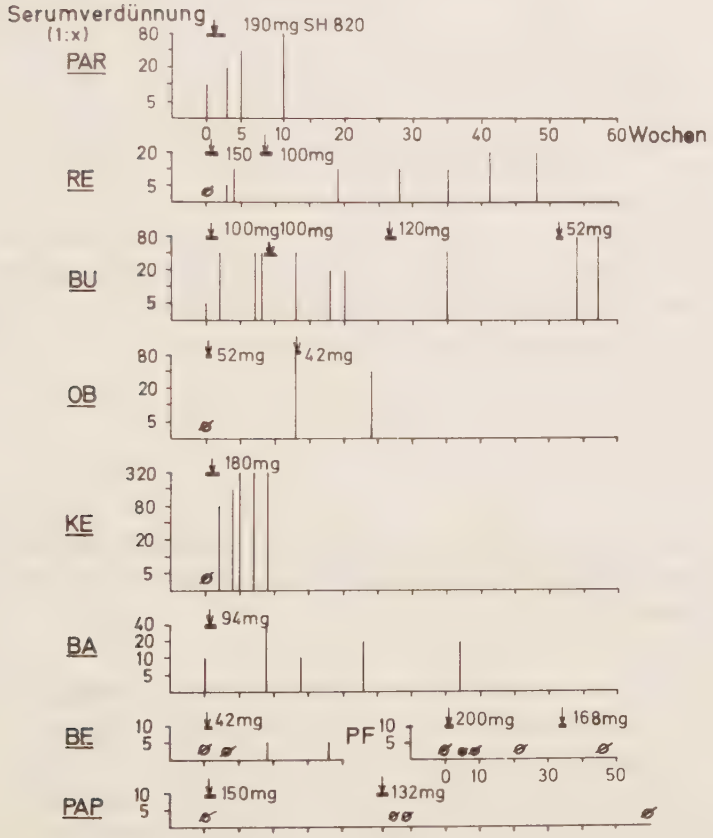
Die höchsten Titer in den einzelnen Patientinnen-Seren konnten

2 - 13 Wochen nach der 1. Behandlung (Titer 1 : 5 bis 1 : 320),
5 - 33 Wochen nach der 2. Behandlung (Titer 1 : 20 bis 1 : 40),
9 Wochen nach der 3. Behandlung (Titer 1 : 80),
3 Wochen nach der 4. Behandlung (Titer 1 : 80)

nachgewiesen werden.

Abbildung 3 soll einen graphischen Überblick über die vorhergehenden Aussagen vermitteln.

Abb. 3: Antikörpertiter gegen Hammelerythrocyten in Patientenseren vor und nach Behandlung mit schafshypophysärem FSH-aktiven Gonadotropin (SH 820)



zu Abbildung 3: Zeitpunkt der Behandlungen mit SH 820, Zeitpunkt des Auftretens der Antikörper und Titerhöhe in den Seren von 9 behandelten Patientinnen.

—— bedeutet Zeitpunkt der Behandlungen mit SH 820

ø bedeutet: weniger als 1 : 5

Die Seren zeigten - sofern sie über genügend lange Zeit hindurch untersucht worden sind - in 7 von 9 Fällen eine Tendenz zum Titeranstieg um 1 - 7 Titerstufen zwischen der 2. - 11. Woche nach der ersten Behandlung mit SH 820, während ein Titerabfall um 1 - 2 Titerstufen zwischen der 14. - 24. Woche nach der ersten Behandlung in 3 Fällen zu beobachten war. In den übrigen Fällen wurde entweder ein zu kleiner Zeitraum untersucht, oder es folgten noch weitere Behandlungen mit SH 820, sodaß der Titer entweder zunächst unverändert blieb, und dann anstieg oder daß er nach vorausgegangenem Abfall wieder anstieg.

In dem untersuchten Zeitraum von insgesamt 2 - 67 Wochen nach der 1. Injektion bzw. 37- 42 Wochen nach der letzten Injektion, in dem es überhaupt zur Antikörperbildung gekommen war, wurde niemals völliges Verschwinden des Antikörper-Titers beobachtet.

III. Therapieerfolge bei den mit SH 820 behandelten Patientinnen - Vergleich unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Antikörper-Titer:

Wie sich aus Tabelle 9 für die vorliegenden Untersuchungen erkennen läßt, bestehen zwischen Therapieerfolg unter der Behandlung mit hypophysärem Schafs-FSH (SH 820) und der in diesen Fällen gebildeten Antikörper gegen Schaferythrocyten keinerlei Zusammenhänge. Sowohl niedere als auch höhere Titer konnten nachgewiesen werden, ohne daß die Wirkung der SH 820 - Behandlung hinsichtlich Basaltemperaturerhöhungen, Ovulationen und sogar Schwangerschaften beeinträchtigt wurde.
So stellte z. B. ein AK-Titer von 1 : 80 für Ovulationsauslösung und Gravidität bei 2 Patientinnen kein Hindernis dar, andererseits aber blieb ein Therapieerfolg nicht nur

beim AK-Titer von 1 : 320 sondern auch bei dem niedrigen Titer von 1 : 5 bei 2 Patientinnen aus, wofür unabhängig vom AK-Titer eine individuell herabgesetzte Ansprechbarkeit der Ovarien auf Gonadotropine ursächlich angenommen werden muß.

Die Antikörper-Titeranstiege zeigten nach Verabfolgung von SH 820 in Mengen von 100 - 225 mg / 10 Tage auch bei 3 Wiederholungen der Kur keine sichere Abhängigkeit von der zugeführten Dosis; nach dieser bei 1 Patientin durchgeführten Behandlung kam es zu einer Schwangerschaft, die durch den vorhandenen Titer 1 : 80 nicht beeinträchtigt wurde.

Eine genaue Zusammenstellung von Therapieerfolg und Titerhöhe soll Tab. 9 zeigen, worin die Diagnose vor Behandlungsbeginn mit angegeben ist.

Tab. 9: Gegenüberstellung von Diagnose vor der Behandlung und Therapieerfolg im Vergleich zu den Antikörpertitern unmittelbar vor und nach den einzelnen Behandlungen mit SH 820-HCG, HMG-HCG und PMS-HCG.

Pat.	Diagnose	AK-Titer vor SH 820 (1:x)	I.Kur-Erfolg mit SH 820	bei Titer (1:x)	spätere Behandlungserfolge					Erfolg
					Kur	Titer (1:x)	Erfolg	Kur	Titer (1:x)	
PAR	sek.Ame.	10	ø	80	HMG HCG	80	Gravid.			
RE	Oligome.	-	Ovulat.	10	SH 820 HCG	20	Gravid.			
BU	sek.Ame.	5	Ovulat.	10	SH 820 HCG	40	Ovulat.	HMG HCG	40	Ovulat.
					SH 820 HCG	80	Ovulat.	HMG HCG	80	Ovulat.
					SH 820 HCG	80	Gravid.			
OB	sek.Ame.	?	ø	80	SH 820 HCG	40	Ovulat.	HMG HCG	40	Ovulat.
KE	Oligome.	-	ø	80	HMG HCG	320	ø			
PAP	Oligome.	-	Spontan-periode (monophas)	-	SH 820 HCG	(5)	7 Tg BT 2 Ovul.			
BA	prim.Ame.	10	Ö-Stim.	40	PMS HCG	20	ø	HMG HCG	20	Ovulat.
PF	sek.Ame.	?	ø	-	HMG HCG	-	1 Ovul. Ö-Stim.	SH 820 HCG		ø
					HMG HCG	-	2xBlutg. spätsekr.			
BE	prim.Ame.	-		5						

IV. Untersuchung der Seren unbehandelter, beliebig ausgewählter Personen mit dem Hämagglutinations-Test:

Eine zusätzliche einmalige Untersuchung frisch gewonnener Seren von 17 nicht hormonbehandelten, beliebig ausgewälten Personen (16 Frauen und 1 Mann) mit dem Hämagglutinations-Test mit nicht-sensibilisierten Hammel-Erythrocyten zeigte erwartungsgemäß, daß 15 von 17 der untersuchten Seren Antikörper-Titer von 1 : 5 bis 1 : 80 aufwiesen; die Mehrzahl der Seren zeigte den Titer 1 : 20.

D. Besprechung

Die Methodik des Hämagglutinations-Tests nach MIDDLEBROOK und DUBOS (1948) und v. BOYDEN (1950) wurde von der überwiegenden Mehrheit der Autoren in Abwandlungen zum Nachweis von Antikörpern bzw. Antihormonen nach verschiedenen Gonadotropin-Applikationen bei Mensch und Tier angewandt.
Frühere Untersuchungen betreffen nur Hormone, die man aus menschlichem Schwangeren- oder Menopausen-Urin oder aus Stutenserum gewonnen hatte, oder Hormone, die noch in relativ unreiner Form aus tierischen oder menschlichen Hypophysen-Extrakten hergestellt worden waren. Bei der vorliegenden Arbeit kam es darauf an, herauszufinden, ob das von der SCHERING AG., Berlin, relativ rein hergestellte SH 820 aus Schafs-Hypophysen noch imstande ist, Antikörper beim Menschen hervorzurufen,

welches Verhalten die Antihormone im Verlaufe einer oder mehrerer Behandlungen zeigen und ob sie wesentlichen Einfluß auf den Therapieerfolg ausüben können.

Von den Autoren, die Antigonadotropinbildung in menschlichen und tierischen Seren feststellten, sollen nur jene Arbeiten genannt werden, die sich in der Serodiagnostik mit Antikörpern gegen Hypophysen-Extrakte beschäftigten, da nur diese Berichte mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind.

Die angestellten Versuchsreihen mit der Hämagglutinations-Technik (HAT) erlauben uns keine genaue Aussage über die Spezifität der erzeugten Antiseren, weder über ihre abgrenzbare Art- noch über genaue Hormonspezifität und ebensowenig über Kreuzreaktionen. Zur Untersuchung wurden nur Seren von Kaninchen und Menschen, O-Blutkörperchen und das follikelstimulierende Hormon (FSH) in Form des Research Präparates SH 820 verwandt. Theoretisch, aber hier nicht experimentell erprobt, können als Kreuzreaktionen solche zwischen HCG-Antiseren und FSH und umgekehrt (ROBYN et al. 1969) sowie Kreuzreaktionen zwischen FSH - Antiserum und LH (= ICSH) vorkommen (SAXENA und HENNEMAN, 1964).

Zur Ergänzung soll hier gesagt werden, daß es heute schon in geeigneten Laboratorien gelingt, homologe Antiseren mit Hilfe von Urinfraktionen herzustellen und dadurch grundsätzlich die Möglichkeit besteht, HCG, LH und FSH durch den Agglutinations-Hemmtest nachzuweisen.

Die verfeinerte Technik in jüngster Zeit erlaubt heute eine recht genaue Gonadotropinbestimmung, vorwiegend für FSH, deren Voraussetzung spezifische Antiseren sind. Als Methode dürfen die Immunelektro- und Chromatophorese (SAXENA et al., 1969) und insbesondere der Radioimmunoassay,

dessen Technik schon YALOW und BERSON (1960) und HUNTER und GREENWOOD (1962) einführten und die für den FSH-Nachweis mit ^{131}J von SAXENA et al. (1966) weiterentwickelt wurde, genannt werden. Da diese Methoden bisher jedoch nur in wenigen Laboratorien möglich sind und die Versuche der vorliegenden Arbeit in vergleichsweise beschränktem Umfang durchgeführt wurden, seien die Antiseren-Gewinnung nach Immunelektrophorese und der Radioimmunoassay hier lediglich erwähnt und der weiteren Besprechung von Ergebnissen vorliegender Arbeit vorangestellt.

Bei keinem der früheren Untersucher findet sich ein Hinweis auf rein spezifische Antihormone, weder im Serum von Kaninchen, die sehr oft im Tierversuch als Antikörperbildner bevorzugt werden, noch in den Seren anderer Versuchstiere oder im Menschenserum. Wie aber CHASE (1945), LEATHEM (1949) und WILLIAMS (1949) nachwiesen, können in Kaninchen unspezifische Antiseren gegen hypophysäres Schafs-FSH auftreten. WILLIAMS (1949) sprach nur von unspezifischen Antigonadotropinen, CHASE (1945) und LEATHEM (1949) berichteten vom Auftreten unspezifischer Antihormone, die nicht artspezifisch und daher gleichermaßen gegen Schaf, Pferd und Mensch gerichtet waren; sie waren auch nicht hormonspezifisch und deshalb gegen Hypophysen-Extrakte wie auch gegen HCG (menschliches Choriongonadotropin) und PMS (Serum schwangerer Stuten) gerichtet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß sich in den gewonnenen Kaninchen-Antiseren spezifische Antikörpergegen SH 820 nachweisen lassen, wobei nicht geprüft wurde, ob es gegen FSH - oder LH - Aktivität gerichtete Antikörper sind.

Zu der Frage, ob die Antikörper artspezifisch und/oder hormonspezifisch sind, kann mit dieser Untersuchungstechnik nur ausgesagt werden, daß die Kaninchen-Antiseren nicht gegen die Spezifität "Hammel" gerichtet sind, weil sie im Hämagglutinations-Test mit reinen unbeladenen Hammelerythrocyten nicht agglutinierten. Ob die Antikörper hormonspezifisch sind, würde sich nur nach einer Auftrennung der im Präparat SH 820 enthaltenen Hormone etwa durch den Radioimmunoassay zeigen lassen.
Der Nachweis von Art-und gleichzeitiger Hormonspezifität für Schafs-FSH oder von Kreuzreaktionen konnte mit dieser Technik ebenfalls nicht erfolgen.

Bei Untersuchungen von JUNGE und WILKEN (1965) mit Schweine-FSH (Folistiman) ergaben sich durch Doppeldiffusionstest im Agar-Gel nach Ouchterlony Präzipitationslinien weder gegen menschliches Choriongonadotropin (HCG) noch gegen menschliches Menopausen-Gonadotropin (HMG), sodaß sie folgern konnten: weder humanes FSH noch LH (welche beide in HMG enthalten sind) sind mit Schweine-FSH antigenetisch verwandt, und FSH ist daher immunologisch weitgehend artspezifisch. Sie hatten Kaninchen 2 mal/Woche mit 200 syn.E. (synergistische Einheiten) von hypophysärem Schweine-FSH, das sie für hochantigen und homogen hielten, über 6 Wochen behandelt.

Die gegen hypophysäres Schafs-FSH (SH 820) gerichteten Kaninchen-Antiseren dieser Untersuchungen ergaben im Hämagglutinationstest mit sensibilisierten menschlichen O-Blutkörperchen einen steigenden positiven Titer, und zwar 8 1/2 Wochen (60 Tage) nach der 7 1/2-wöchigen i.m./i.v.-Behandlung mit insgesamt 18 mg SH 820 den Titer 1 : 5, mit insgesamt 36 mg SH 820 den Titer 1 : 10.

Die reine i.v.-Applikation des Hormons vermochte schon bei geringen Dosen in kürzerer Zeit höhere Titer zu erzeugen: 1 Woche nach der 7-tägigen 1.Behandlung mit insgesamt 17,5 mg SH 820 den Titer 1 : 20, nach einer Pause von einem Monat 1 Woche nach der 3-tägigen 2.Behandlung mit insgesamt 7,5 mg SH 820 sofort den Titer 1 : 40.

Ähnliche zeitliche Zusammenhänge des Auftretens von Antihormonen zeigen sich auch bei anderen Autoren. TAKAHASHI (1939) hatte Kaninchen jeden 2. Tag mit 20 KE (Kaninchen-Einheiten = die Menge, die bei 50 % der Versuchstiere eine Ovulation auslöst oder verhindert) aus Rinder - Hypophysenvorderlappenextrakt 16-64 Tage lang behandelt. Er konnte 3 - 8 Wochen (20-54 Tage) nach der 1. Injektion Antigonadotropinbildung mit der Komplementbindungsreaktion (nach der Browning'schen Methode) nachweisen. Aus Untersuchungen von CHASE (1945) mit dem Präcipitationstest ging hervor, daß Kaninchen unter der Behandlung mit steigenden Mengen (von 0,1 ml bis 1,5 ml) von unverdünntem "Synapoidin" (Schafs-FSH + HCG) intravenös über 15 Wochen Antikörperbildung auftrat und zwar 10 Wochen nach der 1. Injektion mit dem Titer 1 : 80 und 12 Wochen nach der 1. Injektion mit dem Titer 1 : 320, welcher nicht weiter anstieg unter der Behandlung und noch 3 Wochen nach der letzten Injektion erhalten war. 6 Wochen später waren Antikörper nicht mehr nachweisbar. CHASE wies auch darauf hin, daß - durch Arbeiten von COLLIP (1935) über spontanes Auftreten von Antigonadotropinen bei unbehandelten Patientinnen (wie auch TAKAHASHI 1939, EISENHARDT und THOMPSON 1939 und LAROCHE und SIMMONET 1936 berichteten) angeregt - 50 unbehandelte Kaninchen untersucht wurden und daß nur negative Resultate hinsichtlich Antikörpernachweis zu erhalten waren.

Ein Fehlen von Antigonadotropinen in den Kaninchenseren vor der Behandlung kann auch durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit hypophysärem Schafs-FSH (SH 820) bestätigt werden.

Die Patientinnen-Seren weisen ganz andere Ergebnisse auf; sie entsprechen eher den Aussagen der Autoren, die ihre Ergebnisse auf unspezifische Antihormone bzw. Antikörper bezogen:
MADDOCK (1949) berichtete vom Auftreten solcher Antihormone, die 6 - 8 Wochen nach Beendigung einer Injektionsserie über 8 - 15 Wochen mit täglich 50 E. von hypophysärem Schafs-FSH i.m. nachgewiesen werden konnten und die noch 12 - 23 Wochen, in einigen Fällen sogar 41 Wochen nach Behandlungsbeginn vorhanden waren.- Ein anderes Mal (MADDOCK et al., 1956 a) traten die Antihormone erst 8 - 12 Wochen nach der Behandlung über 8 - 15 Wochen mit 25-50 E. von hypophysärem Schweine-FSH pro Tag in allen untersuchten Fällen auf.
Von LEATHEM (1949) wurde in 8-12 Wochen während der Behandlung mit 50 E. von hypophysärem Pferde - FSH /2 mal pro Woche in 11 von 25 Fällen unspezifische Antihormonbildung beobachtet. Bei niedrigerer Dosierung mit einer Kombination von hypophysärem Schafs-FSH und HCG ("Synapoidin") konnte von ihm nur in 5 von 42 Fällen Antihormonbildung nachgewiesen werden.
JUNGCK et al. (1948) konnte bei allen untersuchten 7 männlichen Patienten eine hormon-unspezifische Antihormonbildung ebenfalls schon 8 Wochen nach Behandlungsbeginn feststellen, nachdem ihnen 8 - 15 Wochen lang 50 E. von hypophysärem Schafs-FSH pro Tag injiziert worden waren. Die Antihormone blieben noch 13 - 41 Wochen nach Beginn der Therapie nachweisbar. Dabei fiel den Untersuchern die neutralisierende Wirkung der Anti-

hormone auf die endogenen Hormone auf, die dadurch in ihrer Aktivität gehemmt waren.
Wie bei den Tierseren konnte auch MADDOCK (1949) in den Humanseren eine Artunspezifität und Hormonunspezifität gegen hypophysäres Schafs-FSH entdecken. Der Mangel an Spezifität erwies sich jedoch als unvollständig, da die Antihormone sich nicht gegen hypophysäres Pferde-FSH richteten.

Beachtet man die Tatsache, daß die Antiseren der Patientinnen dieser Versuchsreihe, unabhängig von Zeitdauer und Höhe der FSH-Dosis aus Schafshypophysen-Extrakten (SH 820), im Hämagglutinations-Test mit sensibilisierten, d. h. mit SH 820 beladenen O-Blut-Erythrocyten keinen positiven Antikörper-Titer zeigten, sie dagegen mit nicht-sensibilisierten Hammel-Erythrocyten unterschiedliche Titer aufwiesen, dann muß von vorneherein eine spezifische Antihormonbildung gegen hypophysäres Schafs-FSH (SH 820) ausgeschlossen werden.

So bleibt nur die Möglichkeit offen, daß Antihormone gegen hypophysäres Schafs-FSH (SH 820) - falls sie überhaupt gebildet worden sind - in sehr geringer Zahl auftraten und mit dem HAT nicht erfaßt werden konnten.
Auch SAXENA et al. (1969) und MIDGLEY et al. (1969), um nur diese von den neueren Untersuchern zu nennen, gelangen Antikörper-Nachweise nach FSH-Behandlung bisher nur in Tierversuchen (meist Kaninchen); beim Menschen waren jedoch auch durch den Radioimmunoassay oder die Immunelektrophorese und -absorption noch keine spezifischen Antikörper gegen Gonadotropine, die aus Tierhypophysen-Extrakten gewonnen wurden, nachzuweisen.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Hammelerythrocyten vor der Behandlung bei 3 von 7 untersuchten Patientinnen

Ein Fehlen von Antigonadotropinen in den Kaninchenseren vor der Behandlung kann auch durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit hypophysärem Schafs-FSH (SH 820) bestätigt werden.

Die Patientinnen-Seren weisen ganz andere Ergebnisse auf; sie entsprechen eher den Aussagen der Autoren, die ihre Ergebnisse auf unspezifische Antihormone bzw. Antikörper bezogen:
MADDOCK (1949) berichtete vom Auftreten solcher Antihormone, die 6 - 8 Wochen nach Beendigung einer Injektionsserie über 8 - 15 Wochen mit täglich 50 E. von hypophysärem Schafs-FSH i.m. nachgewiesen werden konnten und die noch 12 - 23 Wochen, in einigen Fällen sogar 41 Wochen nach Behandlungsbeginn vorhanden waren.- Ein anderes Mal (MADDOCK et al., 1956 a) traten die Antihormone erst 8 - 12 Wochen nach der Behandlung über 8 - 15 Wochen mit 25-50 E. von hypophysärem Schweine-FSH pro Tag in allen untersuchten Fällen auf.
Von LEATHEM (1949) wurde in 8-12 Wochen während der Behandlung mit 50 E. von hypophysärem Pferde - FSH /2 mal pro Woche in 11 von 25 Fällen unspezifische Antihormonbildung beobachtet. Bei niedrigerer Dosierung mit einer Kombination von hypophysärem Schafs-FSH und HCG ("Synapoidin") konnte von ihm nur in 5 von 42 Fällen Antihormonbildung nachgewiesen werden.
JUNGCK et al. (1948) konnte bei allen untersuchten 7 männlichen Patienten eine hormon-unspezifische Antihormonbildung ebenfalls schon 8 Wochen nach Behandlungsbeginn feststellen, nachdem ihnen 8 - 15 Wochen lang 50 E. von hypophysärem Schafs-FSH pro Tag injiziert worden waren. Die Antihormone blieben noch 13 - 41 Wochen nach Beginn der Therapie nachweisbar. Dabei fiel den Untersuchern die neutralisierende Wirkung der Anti-

hormone auf die endogenen Hormone auf, die dadurch in ihrer Aktivität gehemmt waren.
Wie bei den Tierseren konnte auch MADDOCK (1949) in den Humanseren eine Artunspezifität und Hormonunspezifität gegen hypophysäres Schafs-FSH entdecken. Der Mangel an Spezifität erwies sich jedoch als unvollständig, da die Antihormone sich nicht gegen hypophysäres Pferde-FSH richteten.

Beachtet man die Tatsache, daß die Antiseren der Patientinnen dieser Versuchsreihe, unabhängig von Zeitdauer und Höhe der FSH-Dosis aus Schafshypophysen-Extrakten (SH 820), im Hämagglutinations-Test mit sensibilisierten, d. h. mit SH 820 beladenen O-Blut-Erythrocyten keinen positiven Antikörper-Titer zeigten, sie dagegen mit nicht-sensibilisierten Hammel-Erythrocyten unterschiedliche Titer aufwiesen, dann muß von vorneherein eine spezifische Antihormonbildung gegen hypophysäres Schafs-FSH (SH 820) ausgeschlossen werden.

So bleibt nur die Möglichkeit offen, daß Antihormone gegen hypophysäres Schafs-FSH (SH 820) - falls sie überhaupt gebildet worden sind - in sehr geringer Zahl auftraten und mit dem HAT nicht erfaßt werden konnten.
Auch SAXENA et al. (1969) und MIDGLEY et al. (1969), um nur diese von den neueren Untersuchern zu nennen, gelangen Antikörper-Nachweise nach FSH-Behandlung bisher nur in Tierversuchen (meist Kaninchen); beim Menschen waren jedoch auch durch den Radioimmunoassay oder die Immunelektrophorese und -absorption noch keine spezifischen Antikörper gegen Gonadotropine, die aus Tierhypophysen-Extrakten gewonnen wurden, nachzuweisen.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Hammelerythrocyten vor der Behandlung bei 3 von 7 untersuchten Patientinnen

sowie bei 15 von 17 willkürlich ausgewählten Versuchspersonen dürfte der normalen Verteilung von Forssmann-Antikörpern bei Menschen entsprechen. Das Ansteigen bzw. Auftreten von Antikörpertitern gegen Schaf-Erythrocyten während der Behandlung mit FSH (SH 820) ist möglicherweise auf geringe Spuren von Forssmann-Antigenen in der FSH (SH 820)-Aufbereitung begründet. Bei den Kaninchen reichten diese Spuren von Antigen nicht zur Antikörperbildung aus. Jedoch handelte es sich bei der Behandlung der Kaninchen um eine Erstimmunisierung, bei den untersuchten Patientinnen konnte dagegen bei einigen bereits eine frühere Sensibilisierung durch die Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden, bei anderen ist sie zumindest sehr wahrscheinlich. Somit dürfte der Titer-Anstieg auf einem Booster-Effekt beruhen. Eine ähnliche Erscheinung zeigten ja auch die Kaninchenversuche, bei denen nach der Zweitimmunisierung mit einer wesentlich geringeren Menge FSH (SH 820) ein Titeranstieg gegen FSH (SH 820) gefunden wurde.
Ein Zusammenhang zwischen der Behandlungsdosis einerseits und der Antikörper-Titerhöhe sowie dem Zeitpunkt des Auftretens der höchsten Titer andererseits konnte nicht nachgewiesen werden. Es handelt sich um individuelle Schwankungen, die möglicherweise durch die Vorsensibilisierung beeinflußt wurden.

Daß eine vorausgegangene Sensibilisierung eine Rolle bei der Antikörper-Bildung spielen kann, zeigt auch ein Fall, der von KEITEL et al. (1968) berichtet wurde:

Bei einer Patientin mit sekundärer Amenorrhoe traten frühe Zeichen von Unverträglichkeit (Erbrechen etc.) auf gegen hypophysäres Schweine-FSH (Folistiman) nach

3-tägiger Behandlung mit je 200 syn. E. (synergistischen Einheiten) mit einer Aktivität von 17 - 20 I.E./mg, kombiniert mit je 2.000 I.E. HCG, sodaß die Therapie unterbrochen werden mußte. Nach 10 Tagen erfolgten erneut Injektionen mit 200 syn. E. Folistiman pro Tag, die ebenfalls am 4. Tag abgebrochen werden mußten. Antikörperbestimmungen nach der 2. Behandlung fielen mit dem Gel-Diffusionstest nach Ouchterlony und der Immunelektrophorese positiv aus. Nach 6 Wochen waren keine Antikörper mehr nachweisbar. Es wurde vermutet, daß die Sensibilisierung durch schweinefleischhaltige Nahrungsmittel enteral erfolgt war, die in der kurzen Behandlungszeit zu Unverträglichkeiten und einem positiven Antikörper-Titer führte.

Die gegen Schaf-Erythrocyten gerichteten Antikörper hatten keinen Einfluß auf die Hormon-Aktivität, soweit das aus den vorliegenden 9 Fällen und den Untersuchungsergebnissen geschlossen werden darf:

Es kam in 3 Fällen zu sicheren Ovulationen, die zu Schwangerschaften führten. In einem Fall trat die Gravidität unter der zweiten SH 820 - Behandlung auf bei einem AK -Titer von 1 : 20, mit der gleichen Dosis SH 820/HCG war 4 Wochen vorher die Ovulation ausgelöst worden, weshalb man unveränderte Wirksamkeit der Hormondosis trotz vorhandener Antikörper bei der Patientin annehmen kann. Im zweiten Fall trat nach vorausgegangener SH 820/HCG-Behandlung die Gravidität unter einer HMG/HCG-Behandlung bei einem Titer von 1 : 80 auf. Die Antikörper haben in diesem Fall die Wirkung auch von HMG/HCG nicht beeinträchtigt. Im 3. Fall trat die Gravidität nach vorausgegangenen SH 820/HCG-Kuren und mehreren HMG/HCG-Kuren und

4. Zum Vergleich mit den Humanseren wurden 6 Kaninchen mit hypophysärem Schafs-FSH (SH 820) behandelt und deren Seren im Hämagglutinations-Test auf Antikörper untersucht. Hierbei ergaben sich genau umgekehrte Ergebnisse wie bei den Menschenseren. Unter steigender Hormondosis fand sich ein Antikörpertiter-Anstieg gegen FSH (SH 820), der bei i.v.-Applikation höher lag als bei einer gemischten i.m./ i.v.-Applikation. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei den Kaninchen-Seren um spezifische Antihormone gegen hypophysäres Schafs-FSH (SH 820) handelte, wobei aber nicht untersucht wurde, ob diese Antihormone nur mit FSH (SH 820) reagieren oder auch mit anderen Hormonen Kreuzreaktionen zeigen.

Antikörper gegen Hammel-Erythrocyten wurden dagegen bei den Kaninchen nicht gebildet.

Literaturangaben:

1. BOYDEN, St.v.: The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera.
J.Exp.Med. 93, 107 (1950)

2. BUTT, W.R.: Chemistry of Gonadotrophins in relation to their antigenic properties.
(Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology)
1 st Symposium, Stockholm 1969
Immunoassay of Gonadotrophins

3. BUTT, W.R. and LYNCH, S.S.: Clin.Chim. Acta 22, 79 (1968), zitiert aus 2.)

4. BUTT, W.R., LYNCH, S.S. and WHYMAN, D.: 1968, b (unpublished; zitiert aus 2.))

5. CHASE, J.H.: Serological and immunochemical studies on the gonadotrophic hormones.
Yale J.Biol. and Med. 17, 517 (1945)

6. COLE, H.H., HAMBURGER, C., and NEIMANN-SØRENSEN , A.: Studies on antigonadotrophins with emphasis on their formation in cattle.
Acta Endocr. 26, 286 (1957)

7. COLLIP, J.B.: Recent studies on antihormones.
Ann.Int.Med. 9, 150 (1935)

8. DAUME, E. Ovarialstimulierung mit tierischen hypophysären FSH-aktiven Gonadotropinen. (Athen 1965) Geburtsh. und Frauenheilk. 26, 600 (1966)

9. DAUME, E. und DÖRNER, G.: Klinische Resultate der Amenorrhoe-Behandlung mit der Kombination Choriongonadotropin und hypophysäres FSH. Berichte III.Weltkongreß Gynäk. Geburtsh. Wien 2, 292 (1961)

10. DÖRFFLER, P.: Über die Antihormonwirkung nach Gonadotropinbehandlung. Klin.Wschr. 36, Nr. 22, 1066 (1958)

11. EISENHARDT, L. and THOMPSON, K.W.: A brief consideration of the present status of so-called pituitary basophilism. Yale J.Biol. and Med. 5, 507 (1939)

12. FRANCHIMONT, P.: Le dosage des hormones hypophysaires somatotropes et gonadotropes et son application en Clinique. Bruxelles 147, 229 (1966)

13. HUNTER, W.M.: J. Endocr. 43, viii (1969) (zitiert aus 2.)

14. HUNTER, W.M., and GREENWOOD, F.: Biochem.J. 85, 39 (1962) (aus: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium, Stockholm 1969)

15. JUNGCK, E.C., MADDOCK, W.O., HELLER, C.G., NELSON, W.O.N.: Antihormone formation complicating pituitary gonadotropin therapy in infertile men.
II. Effect on number of sperm, morphology of the testis and urinary gonadotropins.
J. Clin. Endocr.Vol. 9, No.4, 355, (1948)

16. JUNGE, W. und WILKEN, H.: Immunologische Untersuchungen mit Schweine-FSH (Folistiman). Endokrinologie 48, 293, Heft 5/6 (1965)

17. Mc. KEAN, C.M.: Americ. J. Obstet. Gynec. 80, 596 (1960) (aus: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology 1st Symposium, Stockholm 1969)

18. KEITEL, W., GUTSCHMIDT, H.-J. und ROSAM, W.: Arzneimittelnebenwirkungen durch artfremdes follikelstimulierendes Hormon (FSH). MMW 12, 707 (1968)

19. LAROCHE, G. et SIMMONET, H.: Sur l'existence d'un pouvoir antigonadotrope dans le sérum humain.
Compt.rend.soc.biol. 121, 416 (1936)

20. LEATHEM, J.H.: Recent progress in hormone research. The Antihormone Problem in Endocrine Therapy.
Academic Press, Vol 4, New York, 115 (1949)

21. LEATHEM, J.H., and RAKOFF, A.E.: Equine pituitary gonadotropin and antihormone formation. Endocr. 40, 454 (1947)

22. LEATHEM, J. H., and RAKOFF, A.E.: Studies on antihormone specifity with particular reference to gonadotropic therapy in the female. J. Clin.Endocr. 8, 262 (1948)

23. MADDOCK, W. O.: Antihormone formation complicating pituitary gonadotrophin therapy in infertile men.
I. Properties of the antihormones.
J. Clin.Endocr. 9, No. 3, 213 (1949)

24. MADDOCK, W. O., JUNGCK, E. C., and HELLER, C. G.: Antigonadotrophin formation to sheep FSH. Federat. Proc. 7, 76 (1948)

25. MADDOCK, W. O., LEACH, R. B., TOKUYAMA, I., PAULSEN, C. A., NELSON, W.O., JUNGCK, E. C., and HELLER, C.G.: Antihormone formation in patients receiving gonadotrophin therapy. Acta Endocr. 28, 55 (1956 a)

26. MADDOCK, W. O., LEACH, R. B., TOKUYAMA, I., PAULSEN, C. A., and ROY, W.R.: Effects of hog pituitary folliclestimulating hormone in women: antihormone formation and inhibition of ovarian function. J. Clin. Endocr. and Metab. 16, No.4, 433 (1956 b)

27. MANER, F. D., SAFFAN, B. D., and PREEDY, J. R. K.: Effect of purified ovine pituitary follicle-stimulating hormone (NIH-FSH-1) on the urinary estrogen output of normal menstruating women. J.Clin.Endocr. 22, No. 5, 525 (1962)

28. MIDDLEBROOK, G., and DUBOS, R.J.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. J. Exp. Med. 88, 521 (1948)

29. MIDGLEY Jr., A.R., NISWENDER, G.D., and REBAR, R.W.: Principles for the assessment of the reliability of Radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensivity, specifity) (Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium, Stockholm 1969)

30. ØSTERGAARD, E.: Antigonadotrophic substances. E. Munksgaard, Copenhagen (1942)

31. ØSTERGAARD, E.: Incidence and rate of appearance and disappearance of antigonadotrophin in the blood of patients with pregnant mare's serum gonadotrophin. Acta Endocr. Suppl. 90, 45, 235 (1964)

32. POLLACK, W.: (Ortho Pharmaceutical Corp.): U.S.Patent 3, 234, 096 (March 7, 1961) (aus: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium, Stockholm 1969)

33. RAKOFF. A.E., and LEATHEM, J. H.: Clinical gonadotrophio therapy complicated by antihormone formation. Federat.Proc. 5, 83 (1946)

34. ROBBINS, J. L., HILL, G.A., CARLE, B.N., CARLQUIST, J. H., and MARCUS, S.: Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.), 109, 321 (1962) (aus: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium, Stockholm 1969)

35. ROBYN, C., PETRUSZ, P. und DICZFALUSY, E.:
Acta endocr. (Kbh.) 60, 137 (1969)
(aus: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium Stockholm 1969)

36. ROOS, P.: Human Follicle-Stimulating Hormone. Almquist u.Wiksells A B, Uppsala, (1967)

37. SAXENA, B. B., CARGILLE, C. M., and HENNEMAN, P. H.:
In: The 48th Endocrine Society Meeting 91 (Abstract) (1966)
(aus: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium Stockholm 1969)

38. SAXENA, B. B., HENNEMAN, P. H. (Jersey City, N.Y.):
Immunologic studies with human pituitary follicle-stimulating hormone.
Production of antisera to human FSH and their immunological reactions.
J. Clin. Endocr. Metab. 24, 1271, No. 12 (1964)

39. SAXENA, B. B., LEYENDECKER, G., CHEN, W., GANDY, H.M., and PETERSON, R.E.: Radioimmunoassay of Follicle-Stimulating (FSH) and Luteinizing (LH) Hormones by Chromatoelectrophoresis.
(aus: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium, Stockholm 1969)

40. SPENCE, A. W., SCOWEN, E. F., and ROWLANDS, I. W.:
The absence of antigonadotropic substances in the blood serum of man injected with gonadotropic extracts.
Brit.M.J. 1, 66 (1938)

41. TAKAHASHI, K.: Studien über die antigonadotropische Substanz.
Z.Geburtsh. u. Gynäk. 118, 391 (1939)

42. WIDE, L.: Acta endocr. (Kbh.)
Suppl. 70, 41, 67 (1962)
(aus: Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium Stockholm 1969)

43. WIDE, L., and GEMZELL, C. A.: Acta endocr. (Kbh.) 35, 261 (1960)
(aus: Karolinska Symposia Stockholm 1969)

44. WILLIAMS, P. C.: Proc.Royal Soc. London, 132 B, 189 (1944)
(zitiert nach LEATHEM, 1949)

45. YALOW, R. S., and BERSON, S.A.: J.Clin.Invest. 39, 1157 (1960)
(aus: Karolinska Symposia, Stockholm 1969)

46. ZONDEK, B., and SULMAN, F.: The antigonadotropic factor.
Williams and Wilkins Co., Baltimore (1942)

Herrn Professor Dr. med. E. Daume von der Universitäts-Frauenklinik Marburg/Lahn danke ich für die Überlassung des Themas und für sein ständiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie seinen Anregungen bei den Korrekturen. Ihm und Herrn Professor Dr. med. R. Buchholz, Direktor der Universitäts-Frauenklinik, verdanke ich auch die Beschaffung meines Arbeitsplatzes im Hygiene-Institut zur Durchführung der Experimente. Herrn Professor Dr. med. R. Siegert, Direktor des Hygiene-Instituts, danke ich für die Überlassung dieses Arbeitsplatzes. Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. H.L.Müller, die mich in die experimentelle Arbeit einführte, die Tier- und Laborversuche überwachte und entscheidende Korrekturhilfen gab, sowie den Laborantinnen des Hygiene-Institutes, die stets hilfsbereit meine Versuche unterstützen.

Lebenslauf

Am 2. November 1943 wurde ich, Wiltraud Elisabeth Villinger, als erstes von drei Kindern des Kaufmannes Hans Villinger und seiner Ehefrau Rosemarie, geb. Weimann, in Neudamm/Neumark geboren. 1945 siedelten meine Eltern nach Württemberg über, wo wir zunächst in Ludwigsburg und später in Metzingen wohnten und ich die dortigen Schulen besuchte. Ostern 1962 legte ich am Gymnasium Metzingen die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1962 begann ich in Tübingen das Philosophie-Studium und wechselte im Wintersemester 1962/1963 zum Medizin-Studium über, das ich an der Universität Münster begann. Nach dem Physikum im März 1966 begann ich den klinischen Teil des Studiums an der Universität Wien. Im 3. klinischen Semester setzte ich das Studium an der Universität Marburg fort, das ich am 1. Dezember 1969 mit dem Staatsexamen beendete. Im Februar 1970 begann ich die Medizinalassistenten-Zeit auf der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Böblingen, setzte sie im Juni 1970 an der Universitäts-Hautklinik in Marburg fort bis September 1970. Nach einer Unterbrechung von neun Monaten setzte ich die MA - Zeit auf der chirurgischen und dann auf der internen Abteilung des Kreiskrankenhauses Münsingen fort und erhielt am 29. Februar 1972 die Approbation als Ärztin.

Seit dem Staatsexamen bin ich mit dem Arzt Wolfram Beringer verheiratet. Wir haben inzwischen zwei Kinder, die mich nach der Approbation voll als Mutter beanspruchen, weshalb ich seit dieser Zeit meine ärztliche Tätigkeit unterbrochen habe. Wir wohnen jetzt in Konstanz a. B.

Meine akademischen Lehrer der Medizin waren die Professoren und Dozenten

in Münster: Becher, Brettschneider, Caspers, Eichner, Erhardt, Hoppe, Kaja, Kappler, Klemm, Knoche, Lerche, Micheel, Müller-Limmroth, Pauleikhoff, Rauen, Rensch, Schütz, v. Verschuer.

in Wien: Antoine, Arnold, Asperger, Brücke, Chiari, Deutsch, Fellinger, Fuchsig, Gitsch, Hoff, Hruby, Husslein, Jesserer, Kucsko, Langer, Neuhold, Novotny, Tappeiner.

in Marburg: Behrend, Blum, Bommer, Buchholz, Cleve, Dölle, Gedigk, Hamm, Herrmann, Hettler, Hildebrandt, Jacob, Knauff, Korb, Kreutz, Lehmann-Grube, Linneweh, Mann, Mannheim, Martini, du Mesnil, Oehmig, Rodeck, Rohen, Rupec, Schiff, Schleyer, Schmid, Schneider, Schwaiger, Siegert, Siess, Streicher, Strohmeyer, Voss.